

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-322657

(43)公開日 平成4年(1992)11月12日

(51)Int.Cl.⁵

A 6 1 L 27/00
A 6 1 F 2/02

識別記号 庁内整理番号
Z 7038-4C
7038-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 有 発明の数1(全8頁)

(21)出願番号

特願平3-42272

(62)分割の表示

特願昭61-265564の分割

(22)出願日

昭和61年(1986)11月10日

(71)出願人 391012327

東京大学長

東京都文京区本郷7丁目3番1号

(72)発明者 福田 潤

東京都渋谷区広尾4-1-7-409

(72)発明者 広野 卓志

東京都東大和市桜ヶ丘1-1449-3 2-
3-3

(72)発明者 鳥光 慶一

東京都小平市花小金井南町1-3-15
307

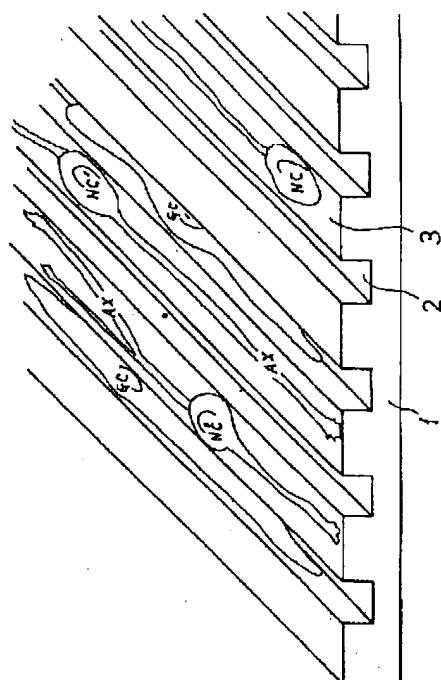
(74)代理人 弁理士 杉村 晓秀 (外1名)

(54)【発明の名称】 生体細胞の成長並びに機能分化の促進・制御方法

(57)【要約】

【目的】 生体細胞又は生体組織に対してそれに接する人工素子との親和性を与えると共に生体防御反応を示すことなく、上記細胞又は組織の成長を促進・制御し機能の分化を促進する。

【構成】 多数の微細な起伏を刻設した表面形状の非多孔質体による人工素子を、神経細胞、筋肉細胞などの生体細胞または組織に接触させる。微細起伏としては幅、深さ共に0.1～1000μmの細条溝が好ましく更に、人工素子表面に生活活性物質を被着することが好ましい。



1

2

【特許請求の範囲】

1. 多数の微細起伏を刻設した表面を具えてなる人工素子の上記表面を、結合組織、神経細胞、グリア細胞、シユワン細胞、皮膚細胞、筋肉細胞、腎臓細胞および肝臓細胞よりなる群から選ばれる生体細胞または生体組織に接触せしめることを特徴とする生体細胞の成長並びに機能分化の促進・制御方法。
2. 微細起伏が細条溝である特許請求の範囲第1項記載の方法。
3. 細条溝が幅約0.1～1000μm、深さ約0.1～1000μmの寸法を有する特許請求の範囲第2項記載の方法。
4. 細条溝が互いに平行である特許請求の範囲第3項記載の方法。
5. 微細起伏表面に更に生物活性物質を被着した前記特許請求の範囲各項のいずれかに記載の方法。
6. 生活性物質がコラーゲン、ポリーレーリシン、ポリーエオルニチン、ラミニン、フィブロネクチン、チックプラズマ、人工脂質膜(LB膜等)、神経成長因子よりなる群から選ばれる特許請求の範囲第5項記載の方法。
7. 前記人工素子が石英ガラス、硬質ガラス、軟質ガラス、有機高分子材料、金属、セラミックス、シリコーンゴム、半導体よりなる群から選ばれた少なくとも一種の物質を含んでなる前記特許請求の範囲各項のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、人工素子、例えば細胞培養容器、人工臓器器材等の人工素子の特定構造を有する表面を生体細胞又は生体組織に接触させて、これらの細胞や組織に増大した親和性と減少した防御反応とを発現させると共に、成長並びに機能分化を促進・制御する方法に関し、細胞工学、組織培養学、医学並びに人工臓器学等に跨がる技術分野において利用されるものである。

【0002】従来、動物細胞、植物細胞、細菌の細胞、カビ細胞等、各種生体細胞の増殖・分化・発生等を人工環境下でコントロールする細胞培養技術の進歩は、2種類の異なった技術改良、即ち、細胞と直接接觸する培養用容器の改良と、細胞に栄養を供する培地の改良とに依っている。これらの内、過去におけるアプローチの主流は後者であった。

【0003】特開昭60-18174号公報には、セラミック焼結体などの多孔質体を骨欠損部に補綴材として充填し、コラーゲン繊維並びに骨破壊細胞に対する多孔質体のバイオフィルターとしての作用を利用して新生骨を誘起する方法が提案されている。しかしながら、この方法は骨成育阻害物質の侵入を阻止することによる消極的新生骨誘起方法であって、生体細胞または生体組織と直接接觸する物体の表面形状を改良することによって積極的にそ

10

20

30

40

50

の成長速度を増大あるいは抑止したり、成長の方向を制御したりする効果を奏するものではない。

【0004】一方、特開昭61-176339号公報には、骨内埋入部に多数の通孔で連通した段違い交叉構造を形成したブレード型骨内インプラントが提案されている。この提案はインプラントの脱落、ガタツキを防止するための機械的結合力の増大を目的としたもので、前記同様に生体細胞や生体組織の成長速度の増大あるいは抑止、成長方向の制御などの効果を發揮させることを意図したものではない。

【0005】また従来、生体中に長時間埋め込むことを意図した人工臓器等の医療用器材は、結合組織細胞との反応性や親和性を高め、いわゆる防御反応を下げるこことを狙い、その材質や巨視的な形状の改良に主力が注がれてきた。

【0006】しかして現在使用されている前記培養容器や人工臓器においては、その巨視的な形状(板状、皿状、筒状、等)も、そしてその材質も極めて多岐に亘るが、それら容器や器具の表面で、細胞に直接接觸し、細胞増殖等に直接関わる部分の形状は、さほど工夫が凝らされぬまゝに放置され、殆どが平滑な表面加工を施してあるか、あるいは、材料本来の平坦な表面形状のまゝであり、表面の微細構造に着目した改良または研究は未だ提案された例を見ない。

【0007】更に、生体細胞や組織の成長方向を制御する技術、例えば、神経突起の成長を方向付ける技術として従来は、細胞をフィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン、ポリオルニチン、NGF(神経成長因子)等の化学物質に沿って、あるいはそれらの存在部位に向かって成長させることにより配向成長させるというものがあった。この方法では、これらの化学物質を、個々の分子に方向性を与えて配置させなければならず、従って、極めて高度の技術を必要とするばかりか、これらの手法は、化学物質の不活性化に伴い、特性が失われるという安定性における難点があった。

【0008】また、従来の方法の一つとして、生体組織および細胞での電場による電界方向への成長誘引も知られているが、この方法では電場の生体組織に与える影響が充分解明されていない等の問題があった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明者等は、従来等閑視されていた、人工素子の表面における微細構造がそれと接觸する生体組織や細胞に特異な性質並びに挙動を与えることを解明し、上述の種々の問題点を解決することに成功し本発明を完成したものである。

【0010】本発明の第一の目的は、接觸する生体細胞ならびに組織が、増大した親和性と減少した生体防御反応とを示す表面を具えた人工素子、例えば細胞・組織等の培養容器、医療用器材等を提供するにある。

【0011】本発明の別の目的は、特定構造の人工素子

を用いて、効果の持続性と安全性とを以って細胞増殖の制御、細胞成長の制御、更には神経再生の制御を可能にせんとするものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】上述の目的は、多数の微細起伏を刻設した表面を具えてなる人工素子の上記表面を、結合組織、神経細胞、グリア細胞、シュワン細胞、皮膚細胞、筋肉細胞、腎臓細胞および肝臓細胞よりなる群から選ばれる生体細胞または生体組織に接触せしめることを特徴とする生体細胞の成長並びに機能分化の促進・制御方法によって達成される。

【0013】すなわち、本発明によれば、細胞培養用容器あるいは医療用器材などの人工素子において、結合組織、神経細胞、グリア細胞、シュワン細胞、皮膚細胞、筋肉細胞、腎臓細胞および肝臓細胞よりなる群から選ばれる生体細胞または生体組織と接する表面に微細な起伏を機械的または化学的手法によって刻設することによって、細胞や組織に対する接着性や選択性を増し、細胞の増殖を制御することが可能となるもので、更にこの起伏を条溝となせば、かゝる条溝に沿って配向した細胞の成長や細胞群の形成を行なわせることもできる。

【0014】

【作用】以下本発明の構成をその作用と共に詳述する。本発明方法に適用する人工素子の生体細胞または組織と接する表面部分は、多数の微細起伏によって粗鬆面をなすか、更に好ましくは多数の細条溝を有してなる。かかる細条溝は、例えば幅、深さともに約 $0.1 \mu\text{m}$ ~ $1000 \mu\text{m}$ の範囲とすることがよく、必ずしも互いに平行である必要もなく、又、幅深さも均一であつたり規則的形状を備えている必要もない。すなわち人工素子の材質、形状に従つて微細条溝の深さや幅は上記範囲内で適宜に変化し得る。条溝断面形状も、V形、U形、ばち形等任意に選定し得る。更に条溝は直線、曲線、波状のいずれの平面形状でもよく、それらが相互に重なり合つて複雑な微細表面構造を作った場合においても上述の特異的効果を奏する。

【0015】しかしながら、上記細条溝の形状・配列は、前記範囲内の幅および深さを具えた直線細条溝を互いに平行に配置することが最も好ましく、かくすることによって細胞増殖の制御、細胞成長の制御、さらには神経再生の制御を可能とするのみならず、生体組織や細胞を容易且つ確実に、しかも適合性よく所望の方向に成長させ得るという驚くべき作用が確認された。すなわち、結合組織性細胞は溝の中に、反対に神経細胞等は歯の上に成長する性質が顕著に現れ、条溝に沿つた配向成長が達成される。

【0016】さらに上記性質は人工素子の表面の起伏に生理活性物質、好ましくは、例えばコラーゲン、ポリ-L-リシン、ポリ-L-オルニチン、ラミニン、フィブロネクチン、チックプラズマ、LB因子（人工脂質膜）お

よりNGF（神経成長因子）よりなる群から選ばれる物質を被着することによって更に増強することができる。

【0017】上述の微細起伏を刻設する人工素子の材質は特に限定されないが、通常、石英ガラス；硬質ガラス；軟質ガラス；有機高分子材料、例えばポリスチレン、ポリ塩化ビニル等のプラスチック、コラーゲン、セルロース、寒天、等；金属；セラミックス、例えばSiN、BN、アパタイト等；シリコーンゴム；半導体、例えばSi、Ge、GeAs、InP、GaSe、InSe等；より選ばれる少なくとも一種であり、また生体高分子、例えばコラーゲン板、プラズマクロットの表面等も包含する。

【0017】本発明方法に適用する人工素子、例えば容器、器材等の全体の巨視的形態は、特に規定しない。すなわち、板状、皿状、球状、繊維状、筒状、粒子状等目的、用途に応じて任意に形成し得るが、少なくとも生体細胞または組織と接する部分の表面に上記微細起伏をえることが肝要である。一般に、細胞培養容器または人工器等の医療器材に適合される人工素子は、平板、円形の皿、太さ $10 \mu\text{m}$ ~ 10cm の円柱状または繊維状、直径 $100 \mu\text{m}$ ~ 10cm の球、あるいは外径 $10 \mu\text{m}$ ~ 10cm の中空円筒形状等である。

【0019】かのような微細起伏を施した表面には、従来の未加工の表面には見いだしえなかつた細胞増殖性、細胞接着性ならびに細胞配列制御性等が付加されるという特異的な作用を發揮する。これらの作用は素子の前記材質の相異によって差があり、また素子の巨視的な形状によってもその程度に変化が認められる。更に素子と相対する細胞や組織の種類、由来する動物の種類、性別、年齢等によっても変化するものである。しかしながら、素子の作用である表面の微細起伏構造に伴なつて生ずる特異な性質は、上記諸要因の影響を超えて普遍的且つ顕著であつて、本発明の目的を充分に達成することができる。

【0020】図1は、微細条溝加工を施した石英ガラス板上における細胞の成長を模式的に示した斜視拡大図である。

【0021】同図において、石英ガラス板1上に断面U型の直線微細条溝2の複数本を互いに平行に刻設し、その面に生体細胞を接觸して培養すれば、神経細胞NCは微細条溝間の歯3の表面部分に、歯に沿つて神経突起AXを再生させるが、グリア細胞などの結合組織細胞GCは条溝2の中に条溝に沿つて突起を成長させる。

【0022】図2は同様にガラス平板1上に刻設した微細条溝2に沿つて細胞Cの成長する様子をイラストして示したものである。更に図3には、プラスチック繊維1'表面に繊維軸に平行に刻設した微細条溝2に沿つて細胞Cが成長する状態を示している。

【0023】本発明方法に用いる人工素子に微細起伏を刻設するには、フォトレジスト法、レプリカ法、スクランチ法、プレス法、エッティング法等を適宜に応用することができる。例えば、図2に示したようなガラス皿、ガ

ラス板等の表面の加工にはフォトレジストを用いたリソグラフィー技術を適用することがよく、また図3の繊維表面あるいはガラス球表面並びにガラス管内部表面の微細加工にも同様の方法を適用することができる。更に、プラスチック皿、繊維等の加工には主として三つの方法が用いられる。すなわち、(1)上述のリソグラフィー法、(2)リソグラフィーで加工したガラス板のレプリカを取り方、および(3)微小な粒子あるいは繊維の切断面により表面にスクラッチ条溝を付ける方法である。更にまた、シリコンゴム、プラスチックチューブ等の表面あるいはコラーゲンを素材とする繊維、プレート、チューブ等の表面の微細加工はガラスチューブのレプリカをとる方法か、あるいはスクラッチ法によることがよい。

【0024】図4はレプリカ法によりプラスチック、シリコンゴム等に微細構造を転写する方法の概要を説明するもので、微細条溝構造を刻設した金属ないしは石英ガラス板等の素材による原型4をもって基材1に転写したシリコンゴム等のレプリカ5を人工素子として実用に供する。

【0025】図5は繊維状の材料の表面に微細条溝を刻設する方法の一例を示すもので、内壁に軸方向の微細条溝を刻設した金属またはガラス円筒を原型4'にして、内部に繊維を通過させ矢印方向に引抜くことにより表面に微細条溝2を刻設した繊維1'よりなる人工素子が得られる。

【0026】図6はスクラッチ法の典型的態様を示すもので、硬質材料よりなる櫛の歯状または鋸歯状の原型4"を、それよりも硬度の小さいプラスチック、ゴム、その他各種材質の板1の表面に圧接して、原型4"と板1とを矢印方向に相対運動せしめ、板表面にスクラッチ性の傷を付けることにより、微細条溝を刻設する。

【0027】

【実施例】次に本発明を更に実施例について説明する。

実施例1

成熟マウスの脊髓後根神経節細胞を採取し、細胞を単離するためにトリプシン、コラゲナーゼ等の酵素で処理した後、幅 $0.5\mu\text{m}$ 、深さ $0.2\mu\text{m}$ の微細条溝を刻設した石英ガラス上および、微細条溝を有しない平滑面の石英ガラス上でそれぞれ培養した。培養液は、ハムス(Hams)F-12培養液とダルベッコ(Dulbecco)MEM液との1:1混合液にプロゲステロン、インシュリン、トランスフェリンを適宜添加したものである。培養は、5%の二酸化炭素を含む空気中 37°C で無血清条件下に24~48時間行なった。培養の結果、神経突起がガラス板上で再生した状態を図7および図8に示す。

【0028】微細条溝を設けない石英ガラス上における神経突起の再生は図8に示すように、軸索再生が起こるが、その方向は一定しない。一方、微細条溝を刻設した(微細条溝は可視光線の解像限界以下の深さ $0.2\mu\text{m}$ 、幅 $0.5\mu\text{m}$ であるため観察されていない)石英ガラス上

では、図7に示す如く微細条溝の方向に沿って配向した軸索再生が観察される。この場合、条溝から外れて突起を伸ばすものも認められるが、その長さは溝方向の突起の20%以下に留まる。

【0029】ソーダガラス、プラスチック、コラーゲン、アバタイト等の材料にそれぞれ微細条溝加工を施した素子を用い、神経細胞の種類、動物の種類、年齢並びに神経周囲組織の種類を変えて、上記同様の方法で培養した結果、若干の差異は認められるものの上記同様の結果が観察された。

【0030】実施例2

受精後15日のニワトリ胎児の脊髓後根神経節細胞と脊髓中の運動神経細胞を別々に取り出し、幅 $5\mu\text{m}$ 、深さ $2\mu\text{m}$ の条溝加工したプラスチック板の溝の両端で同時に培養した。その結果、脊髓後根神経節細胞と運動神経細胞は条溝に沿って成長し、それらの間で、高い効率でシナプス結合を形成した。このとき、脊髓後根神経節細胞に加えた電気刺激は運動神経細胞においても検出され、シナプス結合に特有なしきい値特性が得られた。(神経織維、細胞に対する再生促進性)

【0031】実施例3

本発明方法に適用する素子のなかで、材質がガラスもしくはプラスチックでその表面に幅 $2-10\mu\text{m}$ 、深さ $0.5-1\mu\text{m}$ の溝を有するものの上で、成熟マウスの脊髓後根神経節細胞を、実施例1の方法で培養した。但し、本例では、培地にFCS(牛胎児の血清)を加え、84時間培養する。脊髓後根神経節には神経細胞の他シュワン細胞やグリア細胞が含まれ、これらの細胞は培養中に増殖する。本発明素子の上では神経細胞は90%以上溝の上で生育し、逆に神経以外の細胞は90%以上溝の下で増殖する。この性質の違いから神経細胞と他の細胞をたやすく分離することができ、それそれをわけて収集することができる。(セルソーターの機能)

【0032】実施例4

受精後15日のニワトリより入手した繊維芽細胞、シュワン細胞、皮膚細胞、骨格筋肉細胞、腎臓細胞、肝臓細胞、を本発明方法に適用すべく加工した素子上で培養すると、特異な細胞増殖並びに細胞配置を示し、素子形状と細胞選択性、細胞成長刺激性に固有の関係があることが判明した。とりわけ、細胞配置に特徴のある臓器由来の細胞組織の培養に著明な効果が認められた。これらの特徴は、また、細胞の由来する動物の種類、年齢、培養方法によっても大きく左右された。それぞれの細胞に最適の素子材質、溝形状、幅、深さなどがあたえられた。

(異なる種類の細胞に対する選択性)

【0033】実施例5

石英ガラス板上に幅 $10\mu\text{m}$ 、深さ $3\mu\text{m}$ の微細条溝を所定範囲に刻設し、その範囲外は平滑表面のまゝに残した。その上に前記実施例1と同様な方法で細胞培養を行なったところ、図9に示す如く、条溝のある部分6にお

いては、神經細胞や結合組織の成長は条溝に沿って起こるが、条溝加工の施されていない部分7においては、その成長は一定していなかった。

【0034】実施例6

前記実施例5で用いた石英ガラス板を用い、同実施例と同様の方法で神經細胞を含まない單一種類の細胞（結合組織細胞）の培養を行なった。図10に示すごとく、条溝加工を施した部分6と、施さない部分7とでは、細胞成長の配向性に顕著な差が生ずるとともに、細胞接着性、細胞選択性等にも差が見られた。

【0035】

【発明の効果】本発明は、細胞培養容器あるいは医療用器材において、結合組織、神經細胞、グリア細胞、シュワン細胞、皮膚細胞、筋肉細胞、腎臓細胞および肝臓細胞よりなる群から選ばれる生体組織または生体細胞と接する表面に微細な起伏構造を機械的または化学的に刻設することによって、細胞や組織に対して接着性や選択性を増し、細胞の増殖を制御し、更にこの起伏を細条溝、特に互いに平行な多数の直線状細条溝とすれば、細胞や組織を条溝に沿って配向成長させることができ、より性質の優れた培養容器あるいは医療器材のための素子となすことができる。

【0036】即ち、本発明方法の効果は次の通りに要約される。

1. 細胞の成長促進効果

A. 細胞分裂を促進し細胞増殖を加速する効果。

本発明方法により細胞を培養すると、細胞分裂を要する時間が短くなり、単位時間（例えば1日）内に増殖する細胞数が少なくとも2倍以上に増加する。この際、細胞分裂に伴う様々な現象、例えば細胞の核DNAや、蛋白質の合成量の増加等が同時に観察される。このような効果は細胞分裂能力の優れた細胞、即ち、肝臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、血管形成細胞に顕著である。

【0037】B. 細胞を成長させる効果。

細胞分裂能力の無い細胞や、分裂能力の少ない細胞については、細胞を大きくしたり、あるいは細胞が伸ばしている繊維を長くする効果が認められる。特に、神經細胞についてはその繊維が2～5倍の長さとなり、骨格筋肉繊維については長さが2～3倍となるとともに直径が2～4倍となる。

【0038】2. 細胞機能の分化促進効果

生体内では、細胞は単独でその役割を果たすだけではなく、周囲の細胞と協調し、機能を分担しつつ役割を果たしている。本発明方法に用いる素子は、従来の素子には認められなかつたこのような高度な機能を発現させ得ることが確認された。

【0039】A. 本発明方法により肝臓細胞や腎臓細胞を培養すると、細胞数が増えるのみならず、細胞の高度な機能の発現が促進される。

【0040】即ち、肝臓の細胞については、解毒に直接

50

かかる酵素、例えばペータグルクロニダーゼの活性が5倍以上に上昇する。このような特種酵素活性の上昇は、従来の培養環境では実現されていなかったものである。

【0041】また、腎臓の細胞については、細胞の尿生成・排泄の機能と直接関わる複数の酵素の活性上昇が認められる。

【0042】更に、皮膚細胞については、多重の細胞が配列することによると思われる角質蛋白の合成の増加や、基底膜成分蛋白の合成促進等、より分化した皮膚構造の形成を促していると考えられる様々な現象が観察される。

【0043】B. 細胞分裂を生ずることが少ない筋肉細胞や神經細胞についても、機能の分化を促進して、高度な機能を発現する。

【0044】神經細胞については、既に述べたような神經纖維の成長の方向付けをするだけでなく、神經の特殊な機能、即ち神經回路網の形成に伴う機能が発現する。即ち、神經細胞が化学伝達物質を合成するための酵素、例えば、コリンアセチラーゼ、カテコラミン合成酵素の活性が増加する。また、培養液中における化学伝達物質の放出が数倍増加する。更に神經細胞内で神經機能が高度化したことを見出す各種酵素の増加が認められる。

【0045】筋肉細胞については、その長さや直径が増加するだけでなく、筋肉の収縮機能増加を示すクレアチニンリシン酸化酵素の活性が上昇する。

【0046】以上要するに、(1)従来のような細胞培養法を用いた時には殆ど観察されない現象が、本発明素子を用いると観察されること、(2)かかる現象は、細胞の機能が非常に分化したことを示すと共に、生体内で働いている状態に近付いていることを示すものと考えられる。

【0047】本発明方法に用いる素子は、従来公知の手法、すなわち単に培養容器、医療器材等の表面に成長誘引性の化学物質を塗布したり、熱や放電によって加工するのではなく、素子表面に特殊な微細起伏、とりわけ条溝構造の機械的または化学的加工を施すものであるから、加工技術も比較的簡単容易であり、また大量生産も可能であるのみならず、安定した作用、特性を長期間維持することができる。

【0048】また、従来の方法の一つとして、生体組織及び細胞での電場による電界方向への成長誘引も知られているが、この方法では電場の生体組織に与える影響が十分解明されていない等の問題があった。本発明に適用される素子は、これらの解明の一助をなす素子として利用されるとともに、その特性をセルソーターとしても利用出来る。

【0049】とりわけ、この素子は、その細胞選択性並びに細胞配列制御性に特に優れており、特異な細胞配列の必要な臓器、器官に留置する医用器材の素子たりう

る。すなわち、従来、生体中に長時間埋めこむことを意図した医療用器材は、生体の、いわゆる防御反応を下げる事を狙い、材質や形状の改良に主力がそがれてきていた。しかし本発明にかかる素子は、表面加工の方法によって、特異な細胞群に特異な調和性を持たせるとともに、素子表面に細胞の配列を制御する特異な細胞選択性を持っているため、その性質を利用して、各種の医療用機材の表面被覆用の素子として利用出来る。とりわけ結合組織細胞との反応性、親和性が高いので、素子の材質と、溝加工の工夫により、生体防御反応の低い特性を持つ医療用器材として応用できる。

【0050】以上説明したように、本発明は、化学物質や電場を用いた場合に考えられる様な問題点がなく、簡便にかつ確実に所望の方向に生体組織及び細胞を育成できるという利点がある。従って、本発明は特異的なシナプス形成等のバイオテクノロジーや損傷の治癒促進等の医療、細胞からの物質を抽出する新しい方法を提供する等、物質生産にも応用できるものである。

【0051】特に強調しておきたいのは、本発明が、培養容器材質、大きさ、形状等に制限されず、従来進められていた素材の材質、形状の改良を損なうことなく、巨視的形状を変えることなく、むしろ、従来技術のうえに、付け加わる技術として利用されるということである。本発明による、微細な表面加工により、現有の培養容器、医療用器材に、それまでになかった性質であるところの細胞選択性や、細胞増殖制御性がくわわり、一層性能が高まると考えられる。さらに、本発明に適用する素子は、その元の材質にあまり規定されず、一種類ないしは多種類の材質よりなる容器、器材に適応が可能であり、従来考えられなかつた性質をもつ新たな容器、医療用器材が生まれる可能性が高く、下記の用途において将来性が期待される画期的発明といえる。

【0052】1) 人工臓器、生体内に留置する医用器材。とりわけ人工血管、人工心臓、ベースメーカーの表面素子として。また、神経縫合、移植用の材料、素子として。

10

2) バイオチップ、バイオコンピューター。

3) 細胞分離装置（セルソーター）、細胞クローン化装置

4) 臓器移植、脳、神経移植用器材

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は本発明方法により人工素子上に生体細胞が成長する状態を説明する拡大斜視図である。

【図2】図2は本発明方法により人工素子上に生体細胞が成長する状態を説明する平面図である。

【図3】図3は本発明方法により人工素子上に生体細胞が成長する状態を説明する斜視図である。

【図4】図4は本発明方法に適用する人工素子を製作する方法を説明するための概要側面図である。

【図5】図5は本発明方法に適用する人工素子の別の具体例を製作する方法を説明するための斜視図である。

【図6】図6は本発明方法に適用する人工素子の更に別の具体例を製作する方法を説明するための斜視図である。

【図7】図7は本発明方法に適用する人工素子上に神経突起が再生する状態を示す顕微鏡写真より写生した図である。

【図8】図8は従来公知の人工素子上に神経突起が再生する状態を示す顕微鏡写真より写生した図である。

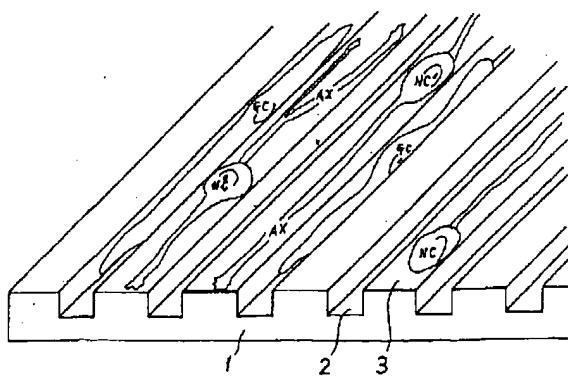
【図9】図9は本発明方法の効果を示すための顕微鏡写真より写生した図である。

【図10】図10は本発明方法の効果を示すための顕微鏡写真より写生した図である。

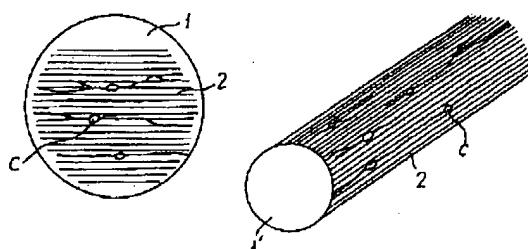
【符号の説明】

- 1 ガラス板
- 1' プラスチック繊維
- 2 微細条溝
- 3 敵
- 4 原型
- 4' 原型
- 4'' 原型
- 5 レプリカ

【図1】

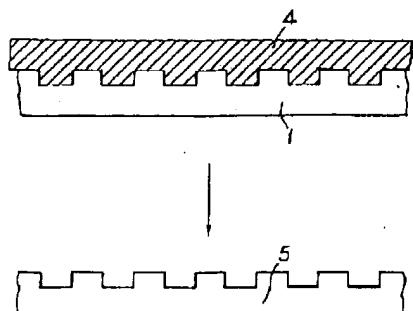


【図2】

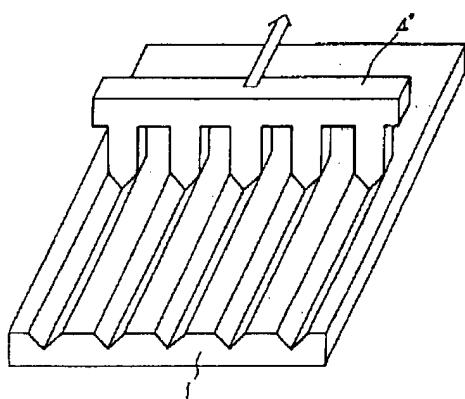


【図3】

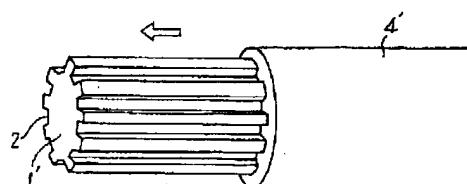
【図4】



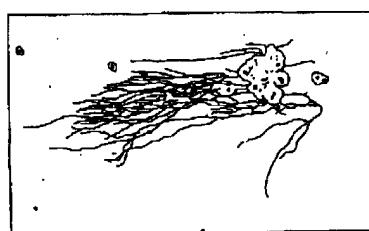
【図6】



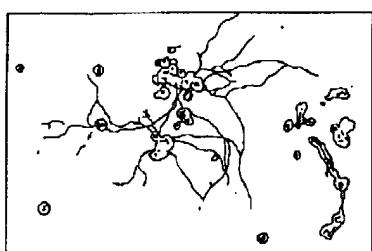
【図5】



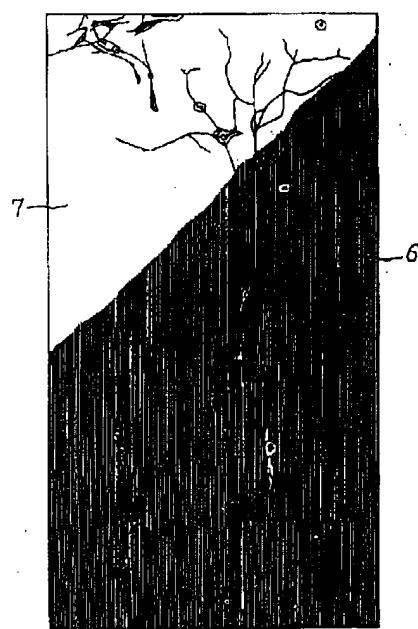
【図7】



【図8】



【図9】



【図10】



PTO 04-3889

Japanese Kokai Patent Application
No. Hei4-322657

METHOD FOR PROMOTING AND CONTROLLING THE GROWTH AND FUNCTIONAL
DIFFERENTIATION OF LIVING CELLS

Jun Fukuda

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
WASHINGTON, D.C. JUNE 2004
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

JAPANESE PATENT OFFICE
PATENT JOURNAL (A)
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 4-322657

Int. Cl. ⁵ :	A 61 L 27/00 A 61 F 2/02
Sequence No. for Office Use:	7038-4C 7038-4C
Filing No.:	Hei 3-42272
Division of:	Japanese Kokai Patent Application No. Sho 61[1986]-265564
Filing Date:	November 10, 1986
Publication Date:	November 12, 1992
No. of Inventions:	1 (Total of 8 pages)
Examination Request:	Filed

**METHOD FOR PROMOTING AND CONTROLLING THE GROWTH AND FUNCTIONAL
DIFFERENTIATION OF LIVING CELLS**

[Seitari saibo no seicho oyobi ni kinodun ka]

Inventors:	Jun Fukuda Sokushin – Seigyo hoho 4-1-7-409 Hiroo Shibuya Ku, Tokyo, Japan
	Takushi Hirono 2-3-3, Sakuragaoka 1-1449-3 Higashi Yamato City, Tokyo, Japan
	Keiichi Torimitsu 1-3-15 Hanakoganei Minami Cho Kodaira City, Tokyo, Japan
Applicant:	The President of Tokyo University

[There are no amendments to this patent.]

Claims

1. A method for promoting and controlling the growth and functional differentiation of living cells, characterized by the fact that living cells or living tissues selected from a group comprising connective tissue, nerve cells, glial cells, Schwann cells, skin cells, muscle cells, kidney cells, and liver cells are brought into contact with the surface of an artificial element that is provided such that multiple minute undulations are scored on said surface.
2. The method according to Claim 1, wherein the minute undulations are minute grooves.
3. The method according to Claim 2, wherein the minute grooves have dimensions of approximately 0.1-1000 mm wide and approximately 0.1-1000 mm deep.
4. The method according to Claim 3, wherein the minute grooves are parallel.
5. The method according to any of the aforementioned claims wherein the minute undulation surface is further coated with a biologically active substance.
6. The method according to Claim 5, wherein the biologically active substance is selected from a group comprising: collagen, poly-L-lysine, poly-L-orthinine, laminin, fibronectin, chick plasma, artificial lipid membrane (LB membrane, and the like), and nerve growth factor.
7. The method according to any of the aforementioned claims wherein the aforementioned artificial element is of at least one type of substance selected from the group comprising: quartz glass, hard glass, soft glass, organic high molecular materials, metal, ceramics, silicone rubber, and semiconductors.

Detailed explanation of the invention

[0001]

Industrial application field

The present invention relates to a method for bringing a surface, having a particular construction of artificial element, such as a cell culture vessel, artificial organ material, and similar artificial element into contact with living cells or living tissues, causing these cells or tissues to express affinity or decreased protective reaction, and promoting and controlling growth and functional differentiation, and it is useful for cellular engineering, tissue culture, medicine, and artificial organs as well as their related cross-disciplinary fields.

[0002]

Conventionally, there have been 2 different kinds of technical improvements that have advanced cell-culture technology in controlled artificial environments for multiplication, differentiation, growth, and the like of animal cells, plant cells, bacterial cells, fungal cells, etc..

Namely, improvements in the culture vessels that come into direct contact with the cells, and improvements in the media that offer nutrients to the cells. Of these, the main approach in the past has been in the latter.

[0003]

In Japanese Kokai Patent Application 60[1985]-18174, a method was proposed for inducing new bones by filling the bone defect area with a porous substance such as a ceramic sintered body, for example, as a prosthetic material, and utilizing the porous body for its effect as a biofilter against collagen fibers and osteoclastic cells. Nevertheless, this method is a preventive method for inducing new bones by preventing the invasion of substances that inhibit bone growth, and does not offer an effect such as controlling the alignment of growth, or positively increasing or suppressing growth rates by improving the surface condition of the physical body that comes into direct contact with the living cells or living tissues.

[0004]

On the other hand, Japanese Kokai Patent Application Sho 61[1986]-176339 proposes a blade-shaped intraosseous implant in which a staggered-stage intersecting structure is formed by connecting multiple through-holes in the part embedded in the bone. The object of this proposal is to increase the mechanical binding power in order to prevent the implant from dropping out or wobbling. It is not designed to express an effect such as controlling the growth alignment, or inhibiting or increasing the growth rate of living cells or living tissues, as was the case in the aforementioned proposal.

[0005]

Also conventionally, with regard to artificial organs and other therapeutic hardware designed for long-term *in vivo* implantation, the main effort in improving materials or macroscopic shapes has been focused on heightening the affinity or reactivity with connective tissue cells, thus reducing the so-called defense reaction.

[0006]

Nevertheless, although there is great diversity in the macroscopic shapes (plate-like, dish-like, tubular, etc.) and materials used in the aforementioned culture vessels or artificial organs presently in use, the surfaces of these vessels and hardware, [namely] the shape of the part that comes into direct contact with cells and that directly relates to cell growth and the like, is left alone without much design being devoted to it, so that the surface is either the even surface shape intrinsic to the material, or [if intrinsically uneven] it is subjected to surface finishing to make it

smooth. We still have not seen any examples proposed of improvements or research focused on the fine structure of the surface.

[0007]

Furthermore, with regard to technology for controlling the growth alignment of living cells or tissues, conventionally as a technology for orienting the growth of neurites, for example, there has been [the technique] of causing oriented growth at sites where chemical substances such as fibronectin, laminin, collagen, polyornithine, NGF (nerve growth factor), and the like are present or along these sites. In this method, these chemical substances must be disposed by giving each individual molecule an orientation, accordingly an extremely high technological level is required, and these methods have the shortcomings in stability, in which specific properties are lost when chemical substance becomes inactive.

[0008]

Also, as one of the known conventional methods, there is growth induction by electric field orientation where living tissues and cells are oriented along an electric field, but this method has problems such as, for example, the fact that effect of electric fields on living tissues is not sufficiently understood.

[0009]

Problems to be solved by the invention

As a result of explicating the microstructures on the surfaces of artificial elements and their special nature and behavior on the living cells and tissues with which they come into contact, which the prior art had viewed casually, the inventors succeeded in solving the problems described above, thus arriving at the present invention.

[0010]

The first object of the invention is to offer an artificial element, for example medical hardware, a culturing vessel for cells or tissues, and the like, furnished with a surface to which living cells and tissues that come into contact will show enhanced affinity and decreased host defense reaction.

[0011]

Another object of the invention is to use an artificial element of a special construction that will make it possible to control neuranagenesis, to control cell growth, and to control cell multiplication, with stability and persistence of effect.

[0012]

Means to solve the problems

The aforementioned object is accomplished by a method for promoting and controlling the growth and functional differentiation of living cells, characterized by the fact, that living cells or living tissues selected from a group comprising connective tissue, nerve cells, glial cells, Schwann cells, skin cells, muscle cells, kidney cells, and liver cells are brought into contact with the surface of an artificial element that is provided such that multiple minute undulations are scored on said surface.

[0013]

More specifically, according to the invention minute undulations are scored by mechanical or chemical means on a surface, being the surface of an artificial element such as a cell culture vessel or therapeutic hardware that comes into contact with living cells or living tissues selected from a group comprising connective tissue, nerve cells, glial cells, Schwann cells, skin cells, muscle cells, kidney cells, and liver cells thus making it possible to increase adhesion and selectivity for cells and tissues, and to control cell multiplication. And by making these undulations grooves, it is possible to form groups of cells and grow cells oriented along the grooves.

[0014]

Operation

The following statements explain the mechanism of the invention and its operation in greater detail. The invented method is applied to the surface portion of the artificial element that comes into contact with living cells and tissue, which is given a rough pore surface by minute undulations or more preferably fine grooves. These fine grooves may have a depth and width ranging from approximately 0.1 mm through 1000 mm, and need not necessarily be parallel, and the depth and width need not be homogeneous and need not be a regular shape. More specifically the depth and width of the fine grooves may vary appropriately within the aforementioned ranges according to the materials and shape of the artificial element. The cross-sectional shape of the grooves may be selected from any shape such as V-shape, U-shape, or dovetail shape, for example. The planar shape may be any shape such as a straight line, curved line, or waveform, and the aforementioned specific effect will be exhibited even if a complex fine surface structure is made with these types overlapping each other.

[0015]

Nevertheless, the best results are obtained when the shape and array of the aforementioned fine grooves are straight-line fine grooves parallel to each other whose width and depth are within the aforementioned range, for not only does this make it possible to control cell multiplication, to control cell growth, and to control neuranagenesis, but it also ensures the astounding effect that the living cells or tissues grow easily and reliably in the desired direction, with good conformance. In other words, the property of growth with the connective tissue cells in the middle of the grooves, and conversely the nerve cells and the like on top of the ridges is conspicuously expressed, thus accomplishing oriented growth along the grooves.

[0016]

Furthermore it is possible to further enhance [the effect] by coating the surface undulations of the artificial element having the aforementioned properties with a biologically active substance, preferably a substance selected from the group comprising collagen, poly-L-lysine, poly-L-orthinine, laminin, fibronectin, chick plasma, LB factor (artificial lipid membrane), and NGF (nerve growth factor).

[0017]

There are no particular limitations on the material for the artificial element that is to be scored with the aforementioned minute undulations, but ordinarily it will be at least one type of substance selected from the group comprising quartz glass; hard glass; soft glass; organic high molecular materials such as polystyrene or polyvinyl chloride and other plastics, collagen, cellulose, agar, and the like; metal; ceramics such as SiN, BN, or apatite, for example; silicone rubber; and semiconductors such as Si, Ge, GeAs, InP, GaSe, or InSe, for example; or it may also contain a surface, for example, of collagen plate or plasma clot.

[0017] (sic; 0018)

There are no particular limitations on the overall macroscopic shape of the artificial element, for example vessel or hardware, to which the present invention is applied. More specifically, it may have any shape according to its object and application, whether plate-shaped, dish-shaped, spherical, fibrous, tubular, or granular, for example, as long as it is possible to provide the aforementioned minute undulations on the surface of those parts that come into contact with living cells and tissues. Generally, artificial elements that are suitable for cell culturing vessels or therapeutic hardware such as artificial organs, for example, are flat plates, circular disks, fibers or cylinders of thickness from 10 mm to 10 cm, spheres of diameter of 100 mm through 10 cm, or hollow cylinders with an outside diameter of 10 mm through 10 cm, for example.

[0019]

A surface provided with such minute undulations exhibits the special effect of cell multiplication properties and cell adhesion properties not observed in prior art unfinished surfaces, and adds to the control of cell alignment and the like. These effects will differ depending on the differences between the aforementioned material for the element, and differences will also be observed according to the element's macroscopic shape. There will also be differences depending on the type of cell or tissue confronting the element, and depending on the species, sex, age, and other factors of the animal from which the cells or tissues are derived. Nevertheless, the special properties arising from the fine undulating structure of the surface, which is the effect of the element, universally and obviously exceed the effects of the aforementioned factors, and enable the object of the invention to be sufficiently accomplished.

[0020]

Figure 1 is an enlarged oblique drawing schematically showing the growth of cells on a quartz glass plate that has been subjected to minute groove finishing.

[0021]

In this figure, several straight minute grooves 2 of cross-sectional U-shape have been scored on quartz glass plate 1. As living cells that are brought into contact with this surface and cultured, there are the nerve cells NC on the surface part of ridge 3 between the minute grooves, which reproduce nerve axons AX along the ridges, whereas connective tissue cells GC such as glial cells and the like grow processes along the groove in groove 2.

[0022]

Figure 2 shows an illustration of the circumstances of growth of cell C along groove 2 that has been similarly scored on glass plate 1. Figure 3 shows the condition of cell C growth along groove 2 scored on the surface of plastic fiber 1' parallel to the fiber axis.

[0023]

The scoring of minute undulations on the artificial element used in the invention method may be by appropriate application of the photoresist method, replica method, scratch method, press method, or etching method and the like. For example, lithographic techniques may be applied to finishing the surface of a glass dish or glass plate and the like, as shown in Figure 2. Or the identical method may be applied to fine finishing of the fiber surface shown in Figure 3, or to the surface of a glass sphere or the inner surface of a glass tube. Three main methods may be used to finish plastic plates, fibers, and the like. Namely, (1) the aforementioned lithographic technique,

(2) the method of taking a replica of a glass plate finished by lithography, and (3) the method of making scratch grooves on the surface by a cutting plane of fibers or minute particles. The glass tube replica method or the scratch method are good for the fine finishing of surfaces of silicone rubber, plastic tubes, and similar surfaces or surfaces of fibers, plates, or tubes and the like using collagen as the material.

[0024]

Figure 4 explains the gist of the method for transferring a fine structure by the replica method to plastic or silicone rubber by offering a practical implementation where replica 5 is an artificial element of silicone rubber or the like, in which prototype 4 of a material such as metal or quartz glass plate on which the minute grooved structure has been scored is used to transfer the fine grooved structure to substrate 1.

[0025]

Figure 5 shows an example of the method for scoringly establishing a fine groove on the surface of a fibrous material. Here fiber 1' is obtained as the artificial element with minute groove 2 scored on its surface by drawing a fiber in the direction of the arrow through the inside of prototype 4', being a metal or glass cylinder having fine grooves scored axially on the inner wall.

[0026]

Figure 6 shows a classical implementation of the scratch method. Here minute grooves are scored by scratchlike scarring of a plate surface by causing a dentate or serrate prototype 4" composed of a hard material to come in contact with the surface of plate 1 composed of a softer material such as plastic, rubber, or similar substance such that prototype 4" and plate 1 move relative to each other along the direction of the arrow.

[0027]

Practical examples

The following statements further explain the invention by means of practical examples.

Practical Example 1

Dorsal spinal root ganglion cells were taken from an adult mouse and treated with enzymes such as trypsin and collagenase, for example in order to isolate cells. These cells were then cultured respectively on quartz glass on which minute grooves had been scored at a width of 0.5 mm and depth of 0.2 mm, and a smoothly surfaced quartz glass having no minute grooves. The culture broth was a 1:1 mixture of Hams F-12 medium and Dulbecco's MEM to which

progesterone, insulin, and transferrin were appropriately added. The culture was conducted for 24-48 h under serum-free conditions at 37°C in air containing 5% carbon dioxide. The results of culturing and the condition of nerve process regeneration on the glass plates are shown in Figure 7 and Figure 8.

[0028]

Figure 8 shows the regeneration of nerve processes on quartz glass that has not been furnished with minute grooves; axon regeneration has occurred but without fixed orientation. On the other hand, when the [cells are grown] on quartz glass furnished with minute grooves as shown in Figure 7 (because they have a depth of 0.2 mm and width of 0.5 mm, which is beyond the resolving limit of visible light, the minute grooves cannot be observed), axon regeneration is observed oriented along the direction of the minute grooves. In this case processes that have departed from the grooves can be observed, but their length does not exceed 20% at the most of the projections oriented to the grooves.

[0029]

Results identical to the above were observed, with minor differences, when the identical method used above was used to culture cells, varying the type of nerve cells, animal species, age, and perineurial tissue, and using elements composed of materials such as soda glass, plastic, collagen, and apatite, for example, that were respectively furnished with minute grooves.

[0030]

Practical Example 2

Dorsal spinal root ganglion cells and spinal motor nerve cells were separately taken from chick fetuses 15 days after fertilization and cultured simultaneously on both ends of grooves on a plastic plate finished with grooves 5 mm wide and 2 mm deep. This resulted in growth of the dorsal spinal root ganglion cells and motor nerve cells along the grooves, with high efficiency of synaptic couplings between them. At this time, electrical stimulus applied to the dorsal spinal root ganglion cells was also detected in the motor nerve cells, thus obtaining the characteristic threshold value characteristics in synaptic couplings. (Enhancement of regeneration of nerve fibers and nerve cells)

[0031]

Practical Example 3

Mature mouse dorsal spinal root ganglion cells were cultivated according to the method of Practical Example 1 on elements to which the present invention had been applied, with the

material being glass or plastic having grooves 2-10 mm wide and 0.5-1 mm deep on the surface. However in this example fetal calf serum (FCS) was added to the medium and it was cultured for 84 h. The dorsal spinal root ganglia contain nerve cells and additionally Schwann cells and glial cells, and these cells multiplied in the medium. On the invented element nerves grew 90% or more in the top grooves, and conversely the non-nerve cells grew 90% or more below the top grooves. From this difference in properties, the nerve cells may be readily separated from other cells, so they can be respectively separated and harvested. (Cell sorter function)

[0032]

Practical Example 4

Fibroblasts, Schwann cells, skin cells, skeletal muscle cells, kidney cells, and liver cells obtained from chicks on the fifteen day after fertilization were cultured on elements finished by the application of the invented method. They showed specific cell multiplication and cellular arrangement, and it was clear that there was a natural relationship between the element shape and cell selectivity and cell growth stimulus. Above all, a pronounced effect was observed in culturing cells and tissues derived from organs with particular cellular arrangement. These particulars varied greatly depending on the age and species of animal cell donor, and the culturing method. For each respective cell there was an optimal element material, groove shape, width, depth, and other parameters. (Selectivity for different types of cells)

[0033]

Practical Example 5

Fine grooves 10 mm wide and 3 mm deep were scored over a certain range on a quartz glass plate, and the rest of the surface was allowed to remain smooth. On the glass plate cells were cultured identical to the method described above for Practical Example 1. As a result, growth of nerve cells and connective tissue occurred along the grooves in the grooved portion 6, as shown in Figure 9, but growth in the ungrooved portion 7 was irregular.

[0034]

Practical Example 6

The quartz glass plate of the aforementioned Practical Example 5 was again used, and a single type of cells (connective tissue cells) that did not include nerve cells was cultured according to the identical method used in that practical example. As shown in Figure 10, there was a pronounced difference in cell growth orientation between grooved portion 6 and ungrooved portion 7, and there was also a difference in cell adhesion and cell selectivity and similar parameters.

[0035]

Effect of the Invention

In the invention, a minute undulating structure is mechanically or chemically scored on the surface of a cell or tissue vessel or therapeutic hardware that comes into contact with living tissue or living cells selected from a group comprising connective tissue, nerve cells, glial cells, Schwann cells, skin cells, muscle cells, kidney cells, and liver cells, which makes it possible to increase adhesion and selectivity for cells and tissues and to control cell multiplication; and when these undulations are fine grooves, or particularly if they are parallel straight fine grooves, it becomes possible to cause oriented growth of cells and tissues along the grooves, thus making it possible to have elements of even better quality for culture vessels or therapeutic hardware.

[0036]

In other words, the effects of the method of the invention may be summarized as follows:

1. Effect in promoting cell growth

1-A. Effect of promoting cell division and accelerating cell multiplication.

When cells are cultured according to the invented method, the time required for cell division is shortened, and the number of cells grown within a unit of time (for example 1 day) is increased by a factor of 2 or more. At this time various phenomena associated with cell division are observed, such as simultaneous increase in the cell's nuclear DNA and the amount of protein synthesized. These effects are pronounced in cells with excellent cell division potential, namely liver cells, kidney cells, skin cells, and angiogenic cells.

[0037]

1-B. Effect in promoting cell growth

An effect is observed wherein cells without division potential or with low division potential grow larger, or the fibers growing from the cells are longer. Specifically, nerve cell fibers grow 2-5 times longer, skeletal muscle fibers grow 2-3 times longer, and the diameter is 2-4 times greater.

[0038]

2. Effect in promoting cell function differentiation

Within a living system, cells not only perform their roles solo but they also perform roles in coordination with neighboring cells, with a division of functions. The element used in the invented

method is observed to allow expression of higher functions that have not been observed in conventional elements.

[0039]

A. When liver cells or kidney cells are cultured according to the invented method, not only does the number of cells increase, but the expression of higher cellular functions is promoted.

[0040]

More specifically, in liver cells the activity of enzymes directly involved with detoxification, such as beta-glucuronidase, increases by a factor of 5 or more. Such an increase in specific enzyme activity has not been realized in conventional culture environments.

[0041]

In kidney cells, an increase was observed in the activity of several enzymes directly related to cellular urogenous and excretory functions.

[0042]

In skin cells, various phenomena were observed that are thought to promote formation of a more differentiated skin structure, such as promotion of basal membrane protein synthesis, or promotion of the synthesis of keratin proteins that are thought to depend on a multilayered cellular arrangement.

[0043]

B. Even in nerve cells and muscle cells where cell division rarely occurs, functional differentiation is promoted, and higher functions are exhibited.

[0044]

In nerve cells, not only is the growth of nerve fibers given an orientation as described above, but also functions characteristic of nerve cells, namely functions that accompany the formation of neural networks, are expressed. More specifically, in nerve cells there is an increase in the activity of enzymes for synthesizing chemical transmitters, for example choline acetylase and catecholamine-synthesizing enzymes. There was also a several-fold increase in the release of chemical transmitters into the culture broth. An increase was also observed in various enzymes in the nerve cells exhibiting heightened nerve function.

[0045]

In muscle cells, not only was there an increase in their length and diameter, but there was also an increase in activity of creatine phosphokinase, which indicates an increase in muscle contractile function.

[0046]

As summarized above, (1) when the invented element was used, phenomena were observed that were mostly unobserved when conventional cell culturing techniques were used; (2) these phenomena are considered indicative of the extreme differentiation of cell functions and indicative of a condition that approximates their working within a living system.

[0047]

The element used in the invented method is not merely finished by conventionally known methods, specifically simply coating a growth-inducing chemical substance on the surface of a culture vessel or medical hardware and the like, or by heat or electric discharge, but has been subjected to mechanical or chemical finishing of specific minute undulations, and a groove structure above all, on the surface of the element, so not only is the finishing technology relatively easy and simple and can be applied to mass production, but it also maintains a stable effect and characteristics over a long period of time.

[0048]

Furthermore, as one example of a conventional method, it is known that when an electric field is involved the growth of living tissues or cells can be induced oriented to the electric field; but this method has problems, for example in that the influence of electric fields on living tissues is not sufficiently understood. An element to which the present invention has been applied can be used as an element for helping to elucidate these problems, and this quality also allows it to be used as a cell sorter.

[0049]

Above all, this element is particularly excellent in controlling cell alignment and cell selectivity, and can be [used] as an element for medical hardware placed in an organ or apparatus that requires a specific cell alignment. More specifically, conventionally medical hardware intended for long-term implantation in living systems aimed at reducing the so-called defense reaction of the living system, and the main effort for improvements in materials and shapes was devoted to this goal. However the element with which the invention is concerned is subjected to a surface finishing method, so it has specific concordance to specific cell groups, and has specific

cell selectivity that controls the alignment of cells on the element's surface, therefore this property is utilized so it can be used as an element for covering the surface of various types of medical hardware. Above all, its has high reactivity with and affinity for connective tissue cells, so by skillfully designing the material for the element and the finishing for the grooves, it can be applied as medical hardware having the property of low host defense reaction.

[0050]

As explained above, the present invention does not have the problems of concern when chemical substances or electric fields are used, and has the advantage of easily and assuredly enabling the growth of living cells and tissues in the desired orientation. Accordingly, the invention offers a new method for biotechnology such as the formation of specific synapses, for therapy for promoting healing of injuries and the like, and for extraction of substances from cells, and it can be applied to the production of substances.

[0051]

What we particularly want to emphasize is that the invention is not limited to culture vessel materials, size, shape, or other parameters, and can be used as an add-on technology supplementing the prior art without losing any of the improvements advanced by the prior art in the materials or shape of hardware, and without changing their macroscopic shape. The present invention may be thought of as increasing the performance of existing culture vessels and medical hardware by applying fine surface finishing to them, giving them cell specificity and cell growth control properties that they did not previously have. Furthermore, there are not very many stipulations about the original material of the element to which the invention applies, and it may be applied to vessels and hardware constituted of one type or multiple types of materials; there is a high possibility that new vessels and medical hardware will be produced having properties not considered by the prior art; it may be called an unprecedented invention with the following applications being anticipated for the future.

[0052]

(1) Artificial organs and medical hardware placed in living systems. Above all as a surface element for artificial blood vessels, artificial hearts, and pacemakers. Also, as an element for nerve sutures and materials for transplantation.

(2) Biochips and biocomputers.

(3) Cell isolation devices (cell sorters) and cell cloning devices.

(4) Hardware for organ transplantation, brain, nerve transplantation.

Brief description of the figures

Figure 1 is an enlarged oblique view explaining the state where living cells are growing on an artificial element according to the invented method.

Figure 2 is a plan view explaining the state where living cells are growing on an artificial element according to the invented method.

Figure 3 is an oblique view explaining the state where living cells are growing on an artificial element according to the invented method.

Figure 4 is a schematic side view explaining the method for preparing an artificial element suitable for use with the invented method.

Figure 5 is an oblique view explaining the preparation of another concrete embodiment of an artificial element suitable for use with the invented method.

Figure 6 is an oblique view explaining the method for preparing yet another concrete embodiment of an artificial element suitable for use with the invented method.

Figure 7 is a sketch of a microphotograph showing the condition in which nerve projections have been regenerated on an artificial element suitable for use with the invented method.

Figure 8 is a sketch of a microphotograph showing the condition in which nerve projections have been regenerated on a conventional, publicly known artificial element.

Figure 9 is a sketch of a microphotograph showing the effect of the invented method.

Figure 10 is a sketch of a microphotograph showing the effect of the invented method.

- | | |
|----|---------------|
| 1 | Glass plate |
| 1' | Plastic fiber |
| 2 | Fine groove |
| 3 | Ridge |
| 4 | Prototype |
| 4' | Prototype |
| 4" | Prototype |
| 5 | Replica |

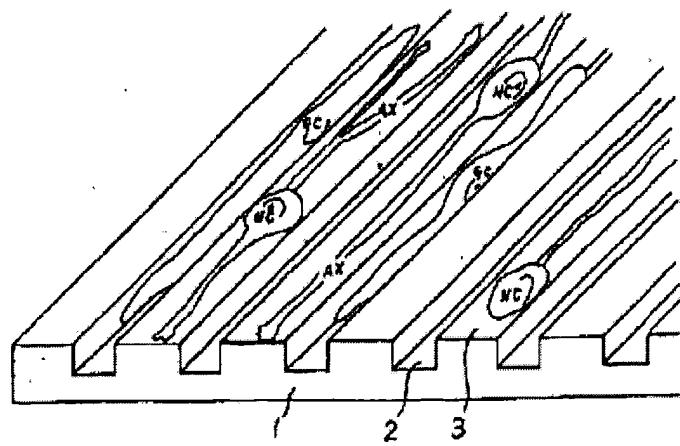


Figure 1

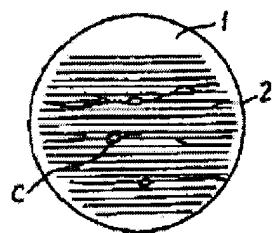


Figure 2

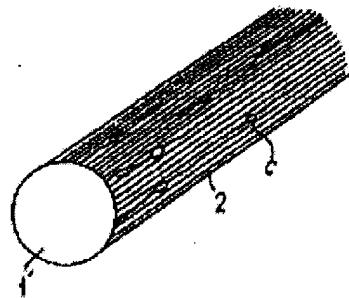


Figure 3

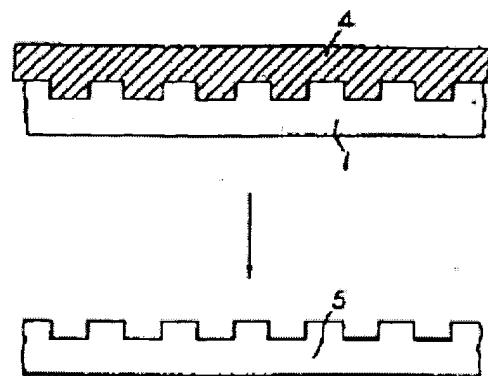


Figure 4

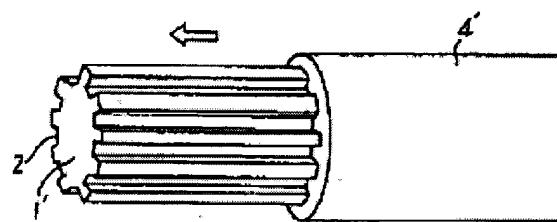


Figure 5

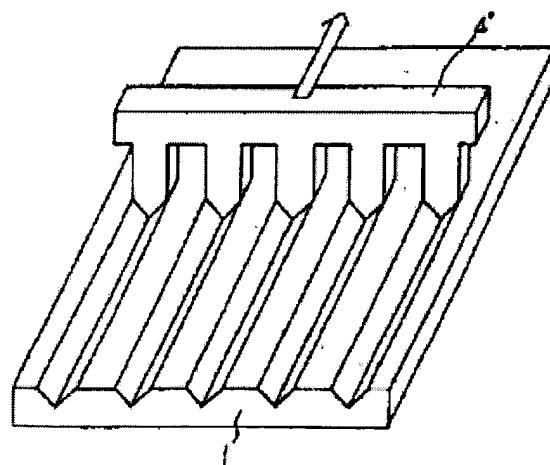


Figure 6

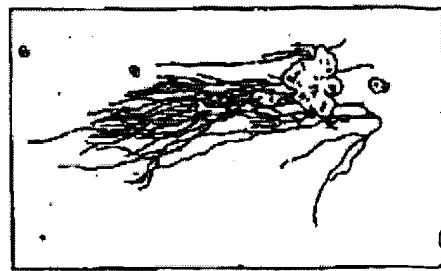


Figure 7

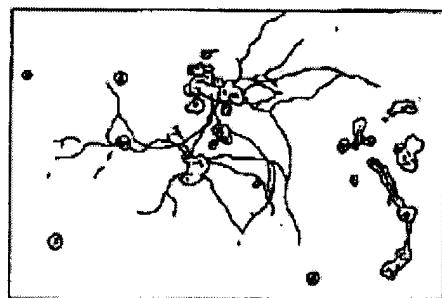


Figure 8

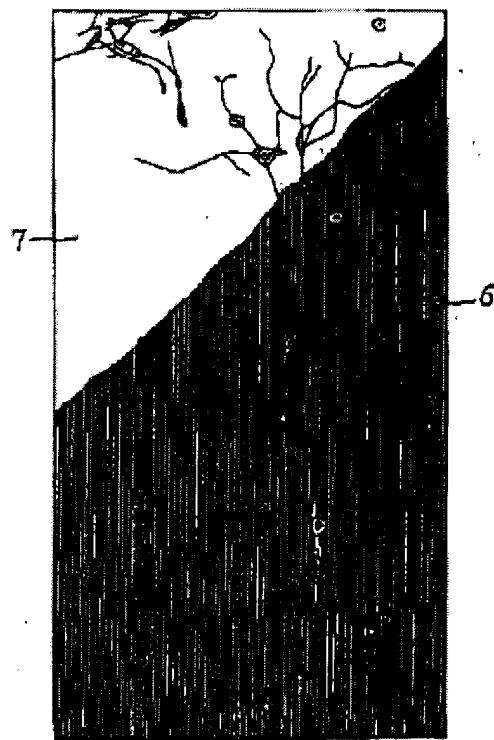


Figure 9

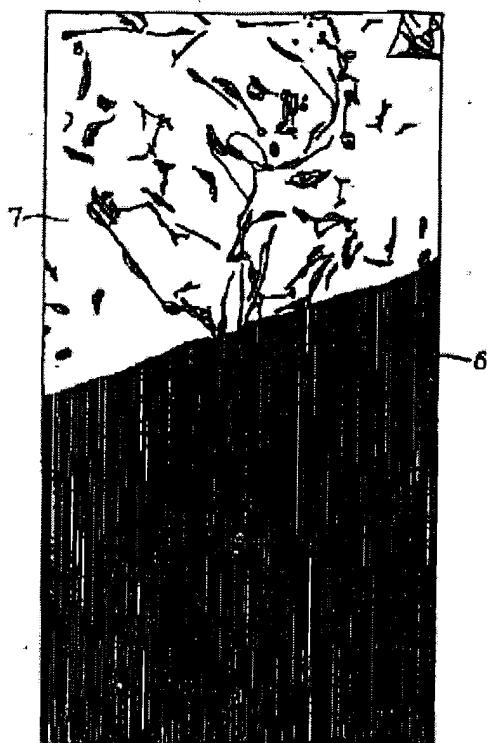


Figure 10